

学校编码 : 10384
学号 : B200125009

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学
理 学 博 士 学 位 论 文

花菁染料在荧光分析中的应用研究
Investigation on the application of cyanine dyes in
fluorescence analysis

朱 昌 青

指导教师姓名 : 许金钩 教授

专 业 名 称 : 分 析 化 学

论文提交日期 : 2004 年 5 月

论文答辩时间 : 2004 年 6 月

学位授予日期 :

答辩委员会主席 :

评 阅 人 :

2004 年 5 月

花菁染料在荧光分析中的应用研究

朱昌青

指导教师：许金钩教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的科研成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	V
第一章 绪论.....	1
第一节 花菁染料的性质和应用研究进展.....	1
1.1.1 引言.....	1
1.1.2 花菁的合成.....	2
1.1.3 花菁的主要性质.....	3
1.1.3.1 花菁的自聚集.....	3
1.1.3.2 光致二聚和异构化性质.....	8
1.1.3.3 花菁的非线性光学性质.....	9
1.1.4 花菁的应用研究.....	9
1.1.4.1 花菁在表面活性剂中的行为研究.....	9
1.1.4.2 花菁用作生物探针研究.....	11
1.1.4.3 花菁用于荧光传感研究.....	14
第二节 论文设想.....	18
1.2.1 选题依据.....	18
1.2.2 拟开展的工作.....	19
参考文献.....	20
第二章 仪器、试剂与探针合成.....	37
第一节 仪器与试剂.....	37
2.1.1 仪器.....	37
2.1.2 试剂.....	37
第二节 部分花菁和酞菁化合物的合成.....	38
2.2.1 七次甲基对称花菁阳离子 — 花菁(I)和(II)的合成.....	38
2.2.2 不对称花菁阳离子 — 花菁(III)的合成.....	40
2.2.3 七次甲基对称花菁阴离子 — 花菁(IV)的合成.....	41
2.2.4 花菁V和VI的合成.....	43
2.2.5 四羧基铝酞菁的合成.....	45
2.2.6 四羧基铁酞菁的合成.....	45
参考文献.....	48

第三章 花菁与表面活性剂的相互作用及其应用	49
第一节 花菁用于表面活性剂的临界胶束浓度测定	49
3.1.1 引言	49
3.1.2 实验方法	49
3.1.3 结果与讨论	50
3.1.3.1 光谱特征	50
3.1.3.2 试验条件对 CMC 测定的影响	52
3.1.3.3 一些 CMC 数据的估测	53
3.1.4 结论	55
第二节 无萃取荧光法测定环境水样中阴离子表面活性剂	56
3.2.1 引言	56
3.2.2 试验方法	56
3.2.3 结果与讨论	57
3.2.3.1 光谱特征	57
3.2.3.2 试验条件优化	59
3.2.3.3 干扰试验	61
3.2.3.4 分析性能	61
3.2.3.5 环境水样中 SDS 测定	62
3.2.3.6 SDS 对花菁荧光猝灭的机理探讨	62
3.2.4 结论	63
本章小结	64
参考文献	64
第四章 直接荧光法测定核酸研究	68
第一节 荧光增强体系测定核酸	68
4.1.1 引言	68
4.1.2 试验方法	69
4.1.3 结果与讨论	69
4.1.3.1 光谱特征	69
4.1.3.2 实验条件的优化	70
4.1.3.3 共存物质的干扰	72
4.1.3.4 标准曲线与样品测定	74
4.1.3.5 花菁和核酸作用的机理探讨	76
4.1.4 结论	77
第二节 近红外荧光猝灭体系测定核酸	77
4.2.1 引言	77
4.2.2 实验方法	77

4.2.3 结果与讨论	78
4.2.3.1 光谱特征	78
4.2.3.2 实验条件的优化	79
4.2.3.3 外加物质的干扰	82
4.2.3.4 工作曲线和样品测定	83
4.2.4 结论	84
本章小结	85
参考文献	85
第五章 花菁三元离子平衡系统在生物大分子测定中的应用	90
第一节 花菁-聚赖氨酸-核酸离子平衡系统	90
5.1.1 引言	90
5.1.2 实验方法	90
5.1.3 结果与讨论	91
5.1.3.1 光谱特征	91
5.1.3.2 实验条件的优化	93
5.1.3.3 共存物质的干扰	95
5.1.3.4 工作曲线和样品分析	96
5.1.4 结论	97
第二节 花菁-聚谷氨酸-蛋白质离子平衡系统	97
5.2.1 引言	97
5.2.2 实验方法	98
5.2.3 结果与讨论	98
5.2.3.1 光谱特征	98
5.2.3.2 实验条件的优化	100
5.2.3.3 共存物质的干扰	102
5.2.3.4 工作曲线和样品分析	102
本章小结	104
参考文献	105
第六章 金属酞菁三元离子平衡系统在核酸分析中的应用	107
第一节 四羧基铝酞菁-聚赖氨酸-核酸离子平衡系统	107
6.1.1 引言	107
6.1.2 实验方法	107
6.1.3 结果与讨论	108
6.1.3.1 光谱特征	108
6.1.3.2 实验条件的优化	110

6.1.3.3 共存物质的干扰.....	111
6.1.3.4 工作曲线和样品分析.....	112
6.1.4 结论.....	112
第二节 四羧基铁酞菁-聚赖氨酸-核酸离子平衡系统.....	113
6.2.1 引言.....	113
6.2.2 实验方法.....	114
6.2.3 结果与讨论.....	114
6.2.3.1 光谱特征.....	114
6.2.3.2 实验条件的优化.....	116
6.2.3.3 共存物质的干扰.....	118
6.2.3.4 工作曲线和样品分析.....	118
6.2.4 结论.....	120
本章小结.....	121
参考文献.....	121
第七章 花菁的羟基脱保护反应用于氟离子显色传感的研究.....	124
7.1 引言.....	124
7.2 实验方法.....	125
7.3 结果与讨论.....	126
7.3.1 光谱特征.....	126
7.3.2 反应介质与 pH.....	128
7.3.3 探针浓度和反应时间.....	128
7.3.4 共存离子的影响.....	129
7.3.5 标准曲线与样品测定.....	129
7.4 结论.....	131
本章小结.....	131
参考文献.....	132
工作特色、创新点及今后努力方向.....	134
博士期间发表和交流的文章.....	135
致谢.....	137

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	V
 Chapter 1 Introduction	1
1.1 Research progress on the properties and applications of cyanine dyes	1
<i>1.1.1 Introduction</i>	1
<i>1.1.2 Synthesis of cyanines</i>	2
<i>1.1.3 The main properties of cyanines</i>	3
<i>1.1.3.1 Self-aggregation</i>	3
<i>1.1.3.2 Photodimerization and isomerization</i>	8
<i>1.1.3.3 Nonlinear optical properties</i>	9
<i>1.1.4 Applications of cyanines</i>	9
<i>1.1.4.1 Study on the behavior of cyanines in surfactants</i>	9
<i>1.1.4.2 Applications of cyanines as biological probes</i>	11
<i>1.1.4.3 Applications of cyanines as fluorescent ion sensors</i>	14
1.2 The objective of this dissertation	18
<i>1.2.1 The basis of selecting this project</i>	18
<i>1.2.2 Research work planning on going to do</i>	19
References	20
 Chapter 2 Apparatus, materials and the synthesis of probes	37
2.1 Apparatus and materials	37
<i>2.1.1 Apparatus</i>	37
<i>2.1.2 Materials</i>	37
2.2 Synthesis of some cyanines and metal phthalocyanines	38
<i>2.2.1 Synthesis of symmetric cationic heptamethylene</i>	

<i>cyanine I and II</i>	38
2.2.2 <i>Synthesis of asymmetric cationic cyanine III</i>	40
2.2.3 <i>Synthesis of symmetric anionic heptamethylene cyanine IV</i>	41
2.2.4 <i>Synthesis of cyanine V and VI</i>	43
2.2.5 <i>Synthesis of aluminum (III) tetracarboxyphthalocyanine</i>	45
2.2.6 <i>Synthesis of iron (III) tetracarboxyphthalocyanine</i>	45
References	48

Chapter 3 Interactions of cyanines with surfactants and their application.....

3.1 Application of cyanines in the determination of critical micelle concentration of surfactants	49
3.1.1 <i>Introduction</i>	49
3.1.2 <i>Experimental</i>	49
3.1.3 <i>Results and discussion</i>	50
3.1.3.1 <i>Spectral characteristics</i>	50
3.1.3.2 <i>Influence of experimental conditions on the determination of CMC</i> ..	52
3.1.3.3 <i>Results of some CMC measurements</i>	53
3.1.4 <i>Conclusion</i>	55
3.2 Fluorescence quenching method for the determination of anionic surfactants in environmental water samples without a procedure of solvent extraction	56
3.2.1 <i>Introduction</i>	56
3.2.2 <i>Experimental</i>	56
3.2.3 <i>Results and discussion</i>	57
3.2.3.1 <i>Spectral characteristics</i>	57
3.2.3.2 <i>Optimization of experimental conditions</i>	59
3.2.3.3 <i>Interference</i>	61

3.2.3.4 Analytical performance.....	61
3.2.3.5 Determination of SDS in environmental water samples.....	62
3.2.3.6 Possible mechanism for the fluorescence quenching of cyanine by SDS	62
3.2.4 Conclusion.....	63
Summary.....	64
References.....	64

Chapter 4 Investigation on direct determination of nucleic acids using cyanines as fluorescent probes.....68

4.1 Fluorescence enhancement method for the determination of nucleic acids.....	68
4.1.1 Introduction.....	68
4.1.2 Experimental.....	69
4.1.3 Results and discussion.....	69
4.1.3.1 Spectral characteristics.....	69
4.1.3.2 Optimization of experimental conditions.....	70
4.1.3.3 Interference.....	72
4.1.3.4 Calibration graphs and the determination of samples.....	74
4.1.3.5 Exploration of interaction mechanism of cyanine with nucleic acids.....	76
4.1.4 Conclusion.....	77
4.2 Near-IR fluorescence quenching method for the determination of nucleic acids.....	77
4.2.1 Introduction.....	77
4.2.2 Experimental.....	77
4.2.3 Results and discussion.....	78
4.2.3.1 Spectral characteristics.....	78
4.2.3.2 Optimization of experimental conditions.....	79

4.2.3.3 <i>Interference</i>	82
4.2.3.4 <i>Calibration graphs and the determination of samples</i>	83
4.2.4 <i>Conclusion</i>	84
Summary	85
References	85

Chapter 5 Application of the ternary association equilibrium systems of cyanines to bio-macromolecule assay.....90

5.1 Association equilibrium system of cyanine–poly-lysine—nucleic acids	90
5.1.1 <i>Introduction</i>	90
5.1.2 <i>Experimental</i>	90
5.1.3 <i>Results and discussion</i>	91
5.1.3.1 <i>Spectral characteristics</i>	91
5.1.3.2 <i>Optimization of experimental conditions</i>	93
5.1.3.3 <i>Interference</i>	95
5.1.3.4 <i>Calibration graphs and the determination of samples</i>	96
5.1.4 <i>Conclusion</i>	97
5.2 Association equilibrium system of cyanine-poly-glutamate—protein	97
5.2.1 <i>Introduction</i>	97
5.2.2 <i>Experimental</i>	98
5.2.3 <i>Results and discussion</i>	98
5.2.3.1 <i>Spectral characteristics</i>	98
5.2.3.2 <i>Optimization of experimental conditions</i>	100
5.2.3.3 <i>Interference</i>	102
5.2.3.4 <i>Calibration graphs and the determination of samples</i>	102
Summary	104
References	105

Chapter 6 Application of the ternary association equilibrium systems of metal phthalocyanine compounds

to nucleic acid assay.....107

6.1 Association equilibrium system of aluminum (III)

tetracarboxyphthalocyanine–poly-lysine—nucleic acid.....107

6.1.1 Introduction.....107

6.1.2 Experimental.....107

6.1.3 Results and discussion.....108

6.1.3.1 Spectral characteristics.....108

6.1.3.2 Optimization of experimental conditions.....110

6.1.3.3 Interference.....111

6.1.3.4 Calibration graphs and the determination of samples.....112

6.1.4 Conclusion.....112

6.2 Association equilibrium system of iron (III)

tetracarboxyphthalocyanine–poly-lysine—nucleic acid.....113

6.2.1 Introduction.....113

6.2.2 Experimental.....114

6.2.3 Results and discussion.....114

6.2.3.1 Spectral characteristics.....114

6.2.3.2 Optimization of experimental conditions.....116

6.2.3.3 Interference.....118

6.2.3.4 Calibration graphs and the determination of samples.....118

6.2.4 Conclusion.....120

Summary.....121

References.....121

Chapter 7 Study on a colorimetric fluoride sensing

using the hydroxy-deprotection reaction of a cyanine.....124

7.1 Introduction.....124

<i>7.2 Experimental</i>	125
<i>7.3 Results and discussion</i>	126
<i>7.3.1 Spectral characteristics</i>	126
<i>7.3.2 Reaction media and pH</i>	128
<i>7.3.3 Influence of probe concentration and incubation time</i>	128
<i>7.3.4 Tolerance of foreign ions</i>	129
<i>7.3.5 Calibration graphs and the determination of samples</i>	129
<i>7.4 Conclusion</i>	131
Summary	131
References	132

The innovation in this dissertation and the prospect of this research field	134
Publications and Presentations during author's Ph.D. study	135
Acknowledgements	137

花菁染料在荧光分析中的应用研究

摘 要

花菁染料具有摩尔吸收系数大和荧光量子产率高的优点。此外，通过共轭链长度的调节，花菁的光谱可以从可见光区一直延伸到近红外区。采用红区测量可有效地排除背景干扰，获得更为理想的分析灵敏度和选择性。花菁的光谱对外界微环境的变化极为敏感，非常适合生物及环境样品的分析研究。事实上，花菁目前已成为荧光分析领域最重要的几类探针之一。本文在前人工作的基础上，继续拓展花菁在环境和生物分析方面的应用。本论文共分七章。

第一章为绪论，首先综述了花菁的分类、合成方法、各种性质和应用，着重介绍了花菁的聚集性质、以及它在表面活性剂胶束体系、生物体系和荧光传感方面的研究进展。然后提出了论文设想。

第二章介绍了本文所涉及的仪器、试剂以及几种花菁和酞菁的合成方法。

第三章研究了花菁在几种表面活性剂溶液中的光谱行为。首先考察了两种花菁(I和II)在不同表面活性剂介质中荧光随表面活性剂浓度在CMC附近的变化。疏水花菁I和II在水中及含有低浓度($< \text{CMC}$)的Triton X-100(TX-100)溶液中荧光是完全猝灭的，但当表面活性剂浓度达到CMC时，荧光迅速回升并达到最大值，荧光强度增幅可达 10^3 。荧光突然回升对应的表面活性剂浓度与文献报道的TX-100的CMC值十分吻合。这一结果表明疏水花菁是一种测量TX-100 CMC值的理想光开关分子。短链花菁I的上述光开关功能不仅适用于非离子表面活性剂，而且适用于阳离子表面活性剂，而长链花菁II仅适用于非离子表面活性剂。在离子型表面活性剂中，花菁II由于其长的疏水烷基链的影

响,分子的主体部分(包括发射团)不能进入胶束内芯,因此其荧光始终猝灭。借助花菁荧光的突变,我们建立了一种测定 CMC 的荧光方法,同相关的分光光度法相比,该法简单直观,可以根据体系是否发光,快速地判断胶束是否已经形成。其次,研究了长链花菁 II 在阴离子表面活性剂 SDS 中的荧光猝灭。光谱分析表明长链花菁 II 与阴离子表面活性剂 SDS 间存在强烈的相互作用(疏水作用和静电作用)。即使在 TX-100 胶束存在下,痕量 SDS 也可引发花菁产生自聚集而猝灭其荧光。根据最佳条件下花菁的荧光猝灭与 SDS 浓度间存在的良好线性关系,我们提出了一种无萃取测定环境水样中 SDS 含量的荧光猝灭方法,该法避免了有毒有机溶剂,可大大简化操作过程。

第四章运用光谱方法研究了两种阳离子花菁(I 和 III)与核酸的相互作用。首先,我们根据核酸对花菁 III 剧烈的荧光增强作用,建立了荧光增强测定核酸的方法,该法具有高的分析灵敏度和宽的线性范围,应用于核酸合成样品和实际样品测定取得了满意效果。根据实验中观察到的强烈的吸收红移和显著的荧光增强,我们初步推断核酸对花菁荧光的增强作用可能是花菁分子以单体形式结合于 DNA 的小沟槽中,沟槽壁抑制了花菁激发态扭转和非辐射衰变;另一种可能是花菁染料在双螺旋 DNA 模板存在下自发组装成螺旋状 J-聚集体。其次,我们研究了核酸对花菁 I 的荧光的猝灭作用。针对花菁在水溶液中稳定性差的缺点,调查了几种表面活性剂胶束对花菁的增稳、增敏作用,最后选用了合适浓度的 TX-100 胶束,建立了测定核酸的红区荧光猝灭方法,并探讨了荧光猝灭机理。

第五章研究了生物大分子对花菁与聚氨基酸多肽间离子缔合平衡的影响。首先调查了花菁 IV-聚赖氨酸-核酸三元离子缔合平衡体系。阴离子花菁 IV 与核酸间缺乏强烈的相互作用,但能和带正电荷的聚赖氨酸发生作用形成离子缔合物。阴离子花菁 IV 在水溶液中有强荧光,但在带正电荷的质子化聚赖氨酸($pK_a \approx 9.9$)存在下,由于形成离子缔合物使花菁 IV 的荧光几乎完全猝灭;

如在该体系中加入核酸，花菁 IV 会回复初始荧光。根据这一事实，我们建立了测定核酸的红区荧光回升方法。与我们以前所报道的应用三元离子缔合平衡体系近红外测定 DNA 的方法相比，本法具有灵敏度高的优势。其次，研究了花菁 I -聚谷氨酸-蛋白质三元离子缔合平衡体系。根据光谱的蓝移（从 696 nm 到 628 nm）和荧光的猝灭，我们判断疏水花菁 I 在水溶液和聚谷氨酸表面分别形成了两种含有不同花菁单体数目的 H-聚集体。在酸性条件下，花菁被带正电荷的蛋白质所取代，导致花菁在聚谷氨酸上所形成的聚集体（II）被破坏，而花菁的聚集体（I）和单体的量增大，荧光增强。根据上述事实我们建立了测定蛋白质的红区荧光回升方法。两种方法都有极高的分析灵敏度，而且荧光激发和发射波长都位于近红区，大大降低了生物分子或基质背景的可能干扰。其中后一种方法对蛋白质测定的特异性差异很小，非常适合血清样品中蛋白质总量的分析测定。

第六章借助三元离子缔合平衡系统，研究了两种金属酞菁化合物在核酸分析中的应用。首先考察了四羧基铝酞菁(AlC_4Pc)-聚赖氨酸-核酸离子平衡系统对 AlC_4Pc 荧光发射的影响，建立了测定核酸的红区荧光回升方法并用于样品分析。其次考察了四羧基铁酞菁(FeC_4Pc)-聚赖氨酸-核酸离子平衡系统对 FeC_4Pc 催化活性的调控作用。 FeC_4Pc 能催化过氧化氢对 DL-酪氨酸的氧化反应而产生强荧光物质。适量聚赖氨酸的加入，能明显降低 FeC_4Pc 的催化活性导致荧光猝灭，但核酸的加入又使荧光回升。机理研究表明， FeC_4Pc 与带正电荷的聚赖氨酸通过静电作用缔合后，由于聚赖氨酸是一种多肽，在其表面单个酞菁分子能有序排列（面对面叠加）形成大的聚集，屏蔽了酞菁的轴向催化位点，造成酞菁催化活性降低。核酸的加入，能将酞菁从聚赖氨酸上解缔成为自由的酞菁分子，催化活性恢复。在最佳条件下，回升的荧光强度与核酸浓度间存在良好的线性关系。根据这个事实，我们建立了测定核酸的动力学荧光增强方法。该法具有动力学方法所固有的高灵敏度和宽线性范围的优点。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库